

Využití sekvenačních metod při vyšetření hereditárních nádorů prsu a vaječníků

Studentka: Kristýna Bednaříková, 3.ročník

Školitelé: Mgr. Tomáš Zavoral

Ústav lékařské genetiky FN Plzeň (ÚLG)

Východisko: Diagnostika hereditárních nádorů přechází v současnosti na sekvenování nové generace (NGS), které se stalo hlavní metodou při diagnostice dědičných predispozic pro vznik karcinomů prsu a vaječníku. Metoda přímé sekvenace se stále využívá pro ověření patogenní varianty diagnostikované metodou NGS. Dědičná nádorová onemocnění tvoří malou, ale významnou část onkologických onemocnění, představují asi 5–10 % všech karcinomů. Práce se skládá z části teoretické a části praktické. V teoretické části je popsána anatomie prsu a vaječníku, hereditární syndromy prsu a vaječníku, karcinom prsu a vaječníku, vybrané predispoziční geny (*BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BARD1*), polymerázová řetězová reakce a sekvenační metody (Sangerovo sekvenování, sekvenování nové generace). Praktická část se zaměřuje na návrh primerů a optimalizaci PCR reakce, sekvenaci vybraných úseků genů a ověření patogenní varianty pomocí sekvenačních metod.

Cíl: Cílem práce bylo získat znalosti o metodách sekvenování DNA (přímá sekvence, sekvenování nové generace), navrhnout primery a optimalizovat PCR reakci, poté osekvenovat vybrané exony genů *ATM* a *BARD1* a vyšetřit přítomnost patogenní varianty v genu *BRCA1*.

Metodika: Byla použita anonymizovaná DNA pacientů, kteří podepsali informovaný souhlas s anonymním využitím DNA pro účely výuky. Pro optimalizaci PCR reakce byly vybrány exony 37 a 40 genu *ATM* a exon 3 genu *BARD1*, primery byly navrženy pomocí online nástroje Primer-BLAST. K navrženým primerům byly přidány univerzální sekvenační primery US1/US2 pro snadnější provedení sekvenační reakce. Produkty PCR reakce byly analyzovány pomocí gelové elektroforézy. Sekvenace vzorků proběhla v genetickém analyzátoru ABI 3130 umístěném v laboratoři ÚLG FN Plzeň.

Výsledky: Analýzou produktů PCR reakce na agarózovém gelu jsme zjistili, že navržené primery poskytují amplifikační produkt při většině použitých teplot annealingu. Pro další analýzu byly použity produkty, u nichž primery nasedaly při teplotě 60 °C. Exony 37 a 40 genu *ATM* byly osekvenovány v obou směrech (forward i reverse) s negativním výsledkem. U exonu 3 genu *BARD1* se sekvenace zdařila pouze v jednom (reverse) směru. Sekvenace neprokázala žádnou odchylku od referenční sekvence. Ve dvou vzorcích byla zjišťována přítomnost patogenní varianty v genu *BRCA1*. U jednoho vzorku byla prokázána patogenní sestřihová varianta c.441+1G>A v heterozygotním stavu, u druhého vzorku byl výsledek vyšetření negativní.

Závěr: I přes rozvoj metod sekvenování nové generace je v diagnostice patogenních variant zodpovědných za vznik karcinomu prsu a vaječníků stále využívána i metoda přímé sekvenace. Námi navržené primery jsou použitelné pro ověření případné patogenní varianty v exonech 37 a 40 genu *ATM* a exonu 3 genu *BARD1*.